DIE ABSORPTIONSSTREIFEN DES BLUTES UND SEINER DERIVATE IM ULTRAVIOLETT.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT ROSTOCK

AGRAR. LANDBAU BIBL.

VORGELEGT VON

REINERT HILLER

AUS BERLIN.

ROSTOCK.

CARL BOLDT'SCHE HOF-BUCHDRUCKEREI.

1904.

Referenten:

Professor Dr. **R. Kobert.**

Professor Dr. **R. Wachsmuth.**

Meinen hochverehrten Lehrern

Herrn Professor Dr. Rudolf Kobert

und

Herrn Professor Dr. Richard Wachsmuth

gewidmet.

Einleitung.

Herr Professor Kobert[1] hat 1900 von neuem auf die Fähigkeit des Blutfarbstoffes, auch im ultravioletten Teile des Spektrums die Strahlen auswählend zu absorbieren, hingewiesen. Er führt in seiner Arbeit Versuche von Soret (1883), d'Arsonval (1890) und Grabe[2] über die ultraviolette Absorption an. Nur die des letztgenannten kommen für den Gegenstand der hier folgenden Arbeit in Betracht. Grabe suchte die ultravioletten Absorptionsspektra des Blutes und seiner Zersetzungsprodukte zu photographieren. Seine Photogramme sind jedoch unbrauchbar, da sie eine Unmenge von Linien enthalten, welche mit dem Blute gar nichts zu tun haben. Eine zinkographische Wiedergabe der Grabeschen Photogramme findet sich in der ersten (aber nicht in der zweiten) Auflage von Koberts Lehrbuch der Intoxikationen[3]. Vier Jahre nach Grabe

[1] Kobert, Beiträge zur Kenntnis der Methaemoglobine. Archiv für die gesamte Physiologie Bd. **82**, 1900, p. 1.

[2] Untersuchung des Blutfarbstoffes für violette und ultraviolette Strahlen. Diss. Dorpat 1892.

[3] Stuttgart 1893, p. 475.

hat Arthur Gamgee[1] die Absorptionsverhältnisse des Hämoglobins und seiner Derivate im Blau und Violett untersucht und Photogramme der nach seiner Meinung hier stattfindenden Absorption aufgenommen. Ohne von dieser Arbeit Kenntnis zu haben[2], haben die Professoren Kobert und Wachsmuth die Frage der ultravioletten Absorption des Lichts durch den Blutfarbstoff im Jahre 1900 von neuem vorgenommen und im physikalischen Institute von Rostock einige Vorversuche angestellt und waren dabei zu dem Resultate gelangt, daß ein Absorptionsvermögen des Blutfarbstoffes im Ultravioletten entschieden vorhanden sei. Auf Veranlassung der beiden genannten Herren wurde die Untersuchung des Absorptionsspektrums im Ultravioletten weiter verfolgt und es soll im folgenden darüber berichtet werden.

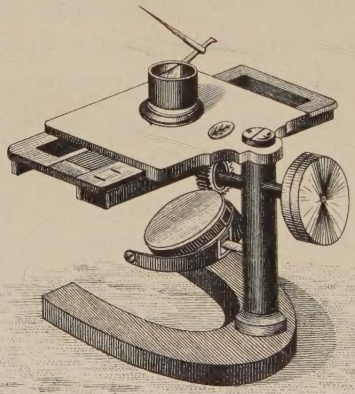
[1] Ztschr. f. Biologie Bd. **34**, 1896, p. 505.

[2] Verfasser lagen diese Arbeiten ebenfalls nicht vor.

Chemische Darstellungsweise.

Bevor auf die erhaltenen Resultate und die angewandten Apparate näher eingegangen wird, soll über die Darstellung der Blutpräparate in kurzen Zügen gesprochen werden. Bei der Herstellung der Blutfarbstoffpräparate muß man zunächst das Serum entfernen. Dies geschieht am besten durch Zentrifugieren oder Absetzen des vom Fibrin befreiten Säugetierblutes. Der Brei der sich dabei abscheidenden Blutkörperchen wird in möglichst wenig destilliertem Wasser gelöst und durch einen Strom von Kohlensäure von den des Farbstoffes beraubten Leibern der Blutkörperchen (Stromata genannt) befreit. Die Kohlensäure macht nämlich diese Stromata wieder sichtbar und erhöht ihre Konsistenz, so daß sie nun durch Zentrifugieren oder Absetzen abgetrennt werden können. Das Blut der Vögel und Amphibien ist ungeeigneter für die Darstellung von Haemoglobinlösungen, weil es auch noch außer den Stromata Kerne besitzt, welche die Darstellung erschweren. Die weitere Reinigung des Blutfarbstoffes geschieht durch starkes Abkühlen, wobei er kristallinisch anschießt und durch Umkristallisieren gereinigt werden kann. Eine andere Methode der Reinigung ist die, daß man die konzentrierte

Lösung des Blutfarbstoffes in Dialysenschläuche füllt und gegen verdünnten Alkohol dialysiert. Dabei gehen störende Salze ins Dialysat, und in den Schläuchen schießen Kristalle an. — Zur quantitativen Bestimmung des Blutfarbstoffes gibt es verschiedene Methoden. Zu klinischen Zwecken dient meist das verbesserte Haemometer von Fleischl[1] und Miescher[2]. Dieses habe auch ich benutzt.



Bei diesem Apparate befindet sich an einem hufeisenförmig versehenen, kurzen Stative ein drehbarer Spiegel, darüber eine kleine Metallplatte und zwischen Tischplatte und Spiegel eine durch ein Triebrad drehbare Rolle. Die letztere verschiebt bei ihrer Drehung unter der Tischplatte dazu eine zweite in einem Scharnier der Tischplatte laufende Schiebplatte.

[1] vergl. Kobert, Lehrbuch der Intoxikationen, zweite Aufl. 1902, p. 59.

[2] Archiv für Anatomie und Physiologie 1901, p. 448.

An dem dem Stativ zugewandten Rande befinden sich die Prozentzahlen von 0—150. Parallel mit der Zahlenreihe läuft ein Keil aus rotem Glase. Das Aufnahmegefäß der Blutlösung ist vertikal in zwei gleiche Teile durch eine dazwischen gelegte Platte geteilt. Die andere ebenso große Gefäßhälfte hat unter sich keinen Keil, so daß vom Spiegel rotes Licht einer Kerze an den Boden der offenen Hälfte, weißes Licht aber zur Blutlösung hingelangt. In einem dunklen Zimmer erscheinen beide Hälften qualitativ gleich, aber quantitativ verschieden rot. Es wird nun die Triebfeder so lange gedreht, bis die Intensität beider Rotfärbungen die gleiche ist. Das verbesserte Haemometer von Miescher wird in einer Arbeit von Franz Müller besonders empfohlen. Verfasser sagt über dasselbe: „Fasse ich das Ergebnis meiner Kritik des Miescherschen Instrumentes zusammen, so kann ich in fast allen Punkten mit dem günstigen Urteil übereinstimmen, das von Veillon über dasselbe gefällt ist. Bei Beobachtungen der von ihm angegebenen Maßnahmen (Dunkelkammer, bestimmte Beleuchtungsquelle, gleiche Lichtintensität) ist sowohl der persönliche als auch durch ungleichmäßige Herstellung des Keiles bedingte Fehler recht gering. Auch für absolute Haemoglobinbestimmungen ist es recht gut brauchbar, doch muß eine genaue Eichung vorbehalten bleiben, auf Grund deren eine etwa vorzunehmende Korrektur der dem Instrument beigegebenen Tabelle bewerkstelligt werden kann".

Nach diesem Autor ist also der Apparat so genau, daß er auch physikalischen und chemischen Ansprüchen

genügt. Eine sehr gute Bestimmung ist auch die, welche das Haemoglobin in Kristallen z. B. nach Hoppe-Seyler darstellen läßt. Die daraus hergestellten Lösungen werden spektrophotometrisch nach Hüfner auf ihren Blutfarbstoffgehalt untersucht.

Das **Oxyhaemoglobin** (abgekürzt O_2Hb) ist diejenige Form des Blutfarbstoffes, die sich in dem von den Lungen zum linken Herzen führenden Blutstrom findet. Es hat eine hellrote Farbe und zeigt im sichtbaren Spektrum das bekannte zweistreifige Absorptionsband im Grünen. Der Sauerstoff ist in demselben nicht fest, sondern locker gebunden und wird beim Durchströmen durch die Gewebe leicht an diese abgegeben. Nach dem oben schon erwähnten Autor Gamgee[1] hat das Oxyhaemoglobin einen dritten Streifen von derselben Intensität im Blau zwischen den Linien *G* und *H* bei den Wellenlängen 404—424 $\mu\mu$, die größte Intensität liegt bei 414 $\mu\mu$, d. h. dicht neben der Linie *H*. Alle drei Streifen sind nach Hoppe-Seyler und nach Gamgee bei einer Schichtstärke von 1 cm und bei einem Gehalt von 0,1 g O_2Hb in 1 Liter Wasser gut wahrzunehmen. Gamgee macht darauf aufmerksam, daß das Haemoglobin das stärkste aktinische und das stärkste sichtbare Licht absorbiert.

Haemoglobin (abgekürzt Hb), oft auch reduziertes Hb zum Unterschiede von dem O_2Hb genannt, entsteht, wenn das Blut seinen Sauerstoffgehalt an die Gewebe abgegeben hat. Es findet sich daher in dem aus den

[1] Arthur Gamgee, Zeitschrift für Biologie Bd. **34**, 1896, p. 505.

Geweben des Körpers kommenden Venenblute und strömt der Lunge zu, wo es wieder in O_2Hb umgewandelt wird. Seine Farbe ist im Gegensatze zu der des O_2Hb keine hellrote, sondern eine dunkle. Das Blut der normalen Leichen enthält fast nur solches sauerstoffreies Hb. Spektroskopisch ist es charakterisiert durch einen Absorptionsstreifen im Grünen. Aus dem Körper entnommen und ins Reagenzglas gebracht, nimmt das Hb an der Oberfläche sofort Sauerstoff auf. Daher muß man es bei der Untersuchung an der Oberfläche mit einer Schicht von Olivenöl oder flüssigem Paraffin bedecken. Will man im Reagenzglase aus O_2Hb Haemoglobin darstellen, so versetzt man es mit Reduktionsmitteln, wie Stokessche Flüssigkeit oder Schwefelammon und überschichtet gleichzeitig mit oben genannten Substanzen.

Methaemoglobin (abgekürzt MetHb) nennt man eine Substanz, welche dieselbe elementare Zusammensetzung hat wie O_2Hb. Jedoch enthält MetHb den Sauerstoff nicht locker, sondern fest gebunden und ist daher nicht imstande, denselben an die Gewebe abzugeben. Bei Giften, wie z. B. chlorsaures Kali, $KClO_3$, welche die MetHb-Bildung im menschlichen Körper erzeugen, entsteht eine sogenannte innere Erstickung. Das MetHb hat eine braune Farbe, die in dicken Schichten schwarzbraun, in sehr dünnen Schichten aber gelbbraun aussieht. Es ist optisch charakterisiert durch mehrere Absorptionsstreifen, von denen einer an der Grenze des Roten und Orange gelegener besonders charakteristisch ist. Dieser ist auch immer gemeint,

wenn in medizinischen Büchern von dem MetHb-Streifen gesprochen wird. Künstlich im Reagenzglase läßt sich MetHb sehr leicht erzeugen, wenn man eine 1—4 % Lösung von O_2Hb-Blut mit einem minimalen Kriställchen von Ferricyan-Kalium schüttelt. Das gewöhnliche MetHb, wie es bei der besprochenen Reaktion entsteht, muß theoretisch als saures MetHb bezeichnet werden. Tatsächlich ist seine Bildung im Menschenblute mit merkbarer Alkaleszenz-Verminderung verbunden. Im Gegensatze dazu bezeichnet man als alkalisches MetHb eine aus dem sauren durch Zusatz von Spuren von Natriumcarbonat-Lösung entstehende Substanz, deren Lösung nicht braun, sondern schön rot aussieht. Das Spektrum dieser Substanz ist im Roten durch kein Absorptionsband ausgezeichnet. Es erinnert vielmehr an das des O_2Hb, nur daß die beiden Streifen im Grünen weniger deutlicher sind als bei O_2Hb. Mit dem alkalischen MetHb dürfen aber nicht einige rot aussehende Derivate des MetHb verwechselt werden. Das wichtigste derselben ist das durch Blausäurezusatz zu brauner MetHb-Lösung entstehende Produkt, welches von seinem Entdecker Kobert zunächst den Namen **Cyanmethaemoglobin** erhalten hatte. Später aber erwies sich dasselbe als sauerstoffrei und muß daher als **Cyanhaemoglobin** (CyHb) bezeichnet werden. Der im MetHb enthaltene Sauerstoff scheidet nämlich in dem Augenblick, wo die Blausäure HCN eintritt, aus der Verbindung aus. Dieses CyHb hat eine schöne rote Farbe und ähnelt dadurch dem alkalischen MetHb, ist aber durch sein Spektrum von diesem verschieden,

denn letzteres gleicht nicht dem des O_2Hb, sondern dem des Hb, d. h. es ist einstreifig und liegt im Grün.

Nitritmethaemoglobin hat dadurch ein größeres Interesse für uns, weil wir es im Schinken und im gepökelten Fleische täglich essen. Es unterscheidet sich vom gewöhnlichen MetHb durch seine rote Farbe und das Fehlen des MetHb-Streifens im Rot. Es entsteht, wenn man zu braunem MetHb Kalium- oder Natriumnitritlösung tropfenweise hinzufügt.

Kohlenoxydhaemoglobin entsteht beim Sättigen von Blut oder einer Haemoglobinlösung mit Kohlenoxyd, und es kann wie Oxyhaemoglobin in Kristallen gewonnen werden. Man kann zur Darstellung auch Leuchtgas verwenden, da dieses kohlenoxydhaltig ist. Die Verbindung ist fester als die des Sauerstoffes im Haemoglobin. Der Sauerstoff wird infolge hiervon leicht aus dem O_2Hb durch Kohlenoxydgas verdrängt. Hierdurch erklärt sich auch die überaus giftige Wirkung des letzteren, welches durch Austreiben des Blutsauerstoffes den Tod herbeiführt. Für den Nachweis des Kohlenoxydhaemoglobins ist die spektralanalytische Untersuchung von größter Bedeutung. Das Spektrum ist dem des Oxyhaemoglobins äußerst ähnlich, zwei Streifen zwischen *D* und *E* gelegen. Der an *D* befindliche ist ein wenig schmaler, als der entsprechende des O_2Hb, auch die Kennzeichnung der Bänder im Ultravioletten ist recht charakteristisch. Die Streifen verändern sich nicht merkbar bei Zusatz von reduzierenden Stoffen, was ein wichtiger Unterschied von O_2Hb ist. Enthält das Blut beispielsweise noch O_2Hb, so erhält man

nach Zusatz von reduzierender Substanz z. B. ammoniakalischer Ferrotartratlösung, ein von Haemoglobin und Kohlenoxyd herrührendes gemischtes Spektrum.

Haematin, auch Oxyhaematin genannt, entsteht bei Zersetzung von Haemoglobin bei Gegenwart von Sauerstoff unter Einwirkung von starken Säuren, starken Basen oder von Kochhitze, wobei Eiweiß abgespalten wird. Die Angaben über die Zusammensetzung des Haematins gehen mitunter recht weit auseinander, vielleicht, daß bei den verschiedenen Bildungsweisen auch verschiedene Haematine entstehen. In der Regel kommt ein Atom Eisen auf je vier Atome Stickstoff. Eine saure Haematinlösung absorbiert am schwächsten den roten, stärker den violetten Teil des Spektrums. Die Lösung zeigt zwischen *C* und *D* einen recht scharfen Streifen, dessen Lage jedoch mit der Art des sauren Lösungsmittels etwas wechseln kann. Zwischen *D* und *F* befindet sich ein breiter Doppelstreifen, der bei großer Verdünnung schwindet. Der letzte Fall jedoch trifft nicht immer zu, wie von mir an verschiedenen Haematinproben festgestellt werden konnte. Der zwischen *C* und *D* befindliche Streifen ist schmal, der Doppelstreifen dunkler und breiter. Endlich beobachtet man noch einen sehr schwachen bei *D* gelegenen Streifen. Das Haematin kann also in saurer Lösung 3—4 Streifen zeigen; gewöhnlich sieht man aber nur deutlich den Streifen zwischen *C* und *D* und den breiten dunklen Streifen resp. die beiden aufgelösten Bänder. In alkalischer Lösung zeigt das Haematin nur einen recht schwachen Streifen zwischen *C* und *D*.

Haemochromogen ist ein Reduktionsprodukt des hydratisierten Haematins und wurde daher von Stokes reduziertes Haematin genannt. Es enthält das Eisen als Ferroverbindung, während es im Haematin als Ferriverbindung besteht. Es läßt sich aus Hb und MetHb durch Erhitzen mit Natronlauge abspalten. Es zeigt ein zweistreifiges Absorptionsband im Grünen. An der Luft verliert Haemochromogen bald seine Farbe und auch das Spektrum zeigt Veränderungen, indem das eine Band nach dem ultravioletten Ende zu sich ausbreitet. Nach einiger Zeit geht das Spektrum gänzlich verloren, deshalb muß man Haemochromogen stets unter Öl aufbewahren.

Haemin ist der Salzsäureester des Haematins und der Ausgangspunkt für die Reindarstellung des letzteren, sowie der Ausgangspunkt des für mich in Betracht kommenden Haematoporphyrins. Es gibt drei Darstellungsweisen des Haemins:

I. Verfahren von Nencki und Sieber[1],

II. Verfahren von M. J. Schalfejeff in der Ausführung von Nencki und Zaleski[2],

III. Verfahren von K. A. Mörner, das von mir angewandt wurde.

Ein Liter Blut wird mit drei Litern Wasser gemischt und nach Zusatz von 10 ccm 1 % Schwefelsäure bis zum lebhaften Aufwallen erhitzt. Das Coagulum wird koliert und scharf ausgepreßt. Dann wird es mit einem halben Liter 90 % Alkohol angerieben und wieder

[1] Archiv für exp. Pathologie und Pharmakologie **18**, 401.

[2] Zeitschrift für physiolog. Chemie 1900, **30**, 389.

stark abgepreßt. Jetzt wird der Blutkuchen mit 1750 ccm 90 % Alkohol, dem ein erkaltetes Gemisch von 17,5 ccm Schwefelsäure und 17,5 ccm 90 % Alkohol zugesetzt ist, verrieben und bei Zimmertemperatur eine Stunde digeriert, dann koliert, der Rest ausgepreßt. Die erhaltene dunkel gefärbte Lösung wird filtriert, das Filtrat rasch zum Sieden erhitzt und jetzt pro Liter 8 ccm 25 % Salzsäure, die mit za. 12 ccm 90 % Alkohol versetzt sind, eingetragen und durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt. Nach zweitägigem Stehen wird der über dem abgesetzten Haemin stehende Alkohol abgegossen, der Kristallbrei abgesaugt, mit etwas Weingeist gewaschen und in gelinder Wärme getrocknet.

Haematoporphyrin. Das nach diesem Verfahren gewonnene Haemin wurde benutzt, um daraus Haematoporphyrin darzustellen. Von der Substanz wurde ein 0,528 gr Hb entsprechendes Quantum mit 10 ccm konz. Schwefelsäure verrieben und unter häufigem Umrühren einen Tag lang stehen gelassen; sodann wurden 42,8 ccm Alkohol vorsichtig zugesetzt und das ganze durch Asbest und Glaswolle filtriert. Die Lösung sieht rot aus, hat aber einen Stich ins Grünliche. Nach dem Filtrieren wurde die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen (welches das Gemisch hat) an Alkohol nachgewaschen, d. h. mit 52,8 ccm. Es waren also vorhanden $2 \times 52{,}8$ ccm Flüssigkeit und 0,528 umgewandeltes Oxyhaemoglobin, d. h. es entsprach die Lösung $^1/_2$ % Oxyhaemoglobin, enthielt nun aber kein Oxyhaemoglobin und kein

Haematin bezw. Haemin, sondern Haematoporphyrin. Dasselbe zeigt in saurer Lösung zwei, in alkalischer dagegen vier Absorptionsstreifen.

Physikalische Untersuchungsmethode.

Alle bisher vorliegenden Angaben über die Absorption des Lichtes durch Blutfarbstoffe beziehen sich auf den sichtbaren Teil des Spektrums.

Da das Auge das Maximum seiner Empfindlichkeit im Gelbgrünen hat, jenseits des Violett dagegen nur durch Fluoreszenzerscheinungen Lichteindrücke empfängt, so war man für genaue Bestimmungen von vornherein auf photographische Aufnahmen angewiesen. Benutzt man zur spektralen Zerlegung ein Glasprisma und verwendet zur Aufnahme gewöhnliche photographische Platten, so zeigt sich, daß die roten Strahlen von *A* bis *C* ebenso wie die gelben und grünen Strahlen von *C* bis *E* nur geringe chemische Wirkung äußern. Von da an steigt die photographische Wirkung rasch an, erreicht zwischen *C* und *H* ihr Maximum, fällt dann ab, nimmt bei *J* wieder zu und hört dann allmählich ganz auf. Dieses Resultat kann aber durch eine Reihe von Umständen ganz erheblich beeinflußt werden. Zunächst durch die Wahl der Linsen und des Prismas. Da nämlich die Dispersion der verschiedenen Glassorten ungleich ist, so weichen auch die photographischen Resultate von einander ab. Außerdem absorbieren aber alle Glassorten das ultraviolette

Licht. Gute Ergebnisse waren nur von einem Material zu erwarten, welches die ultravioletten Strahlen durchließ. Ferner hängt die chemische Wirkung etc. sehr von der Empfindlichkeit der photographischen Platten ab. Diesen Gesichtspunkten mußte vor allen Dingen bei der Photographie des Blutspektrums im Ultravioletten Rechnung getragen werden.

Für die angestellten Versuche wurden nur Quarzprismen und Quarzlinsen angewandt. Die optischen Eigenschaften des Quarzes, die Linear- und Zirkular-Polarisation, machen besondere Vorschriften für die Herstellung des Quarzprismas erforderlich. Es würde z. B. ein Prisma, dessen Kante parallel zur optischen Axe läuft, jeden einfallenden Strahl in zwei linear polarisierte zerlegen. Jeder von diesen beiden würde natürlich für sich je ein Spektrum erzeugen, und auf diese Weise zu Störungen Anlaß geben. Das Prisma mußte demnach so hergestellt werden, daß die Prismaaxe senkrecht zur optischen Axe des Kristalls steht, und seine Flächen gleiche Winkel mit dieser einschließen. Der Umstand, daß jeder den Quarz in der Richtung der optischen Axe durchlaufende Strahl gedreht wird, hat wieder eine Verdoppelung der Spektrallinien zur Folge, wodurch die Deutlichkeit der Spektra beeinträchtigt wird. In dem angewandten Apparate, der weiter unten noch genauer beschrieben wird, befanden sich zur Kompensation der Drehung zwei Prismen, das eine aus rechtsdrehendem, das andere aus linksdrehendem Quarze, jedoch mit gleich brechendem Winkel von 32°. Da sich hierbei einige Licht-

reflexe geltend machten, so kittete man beide Prismen nach Angaben von Königsberger[1] mit einem Tropfen Glycerin zusammen. Somit wurde die Wirkung eines einzigen Prismas mit einem brechenden Winkel von 64° erreicht, dem günstigsten Dispersionswinkel. Mit Glasprismen erhält man photographische Spektra nur bis zu einer Wellenlänge von 320 $\mu\mu$. Kürzere Wellenlängen werden von sämtlichen Glassorten völlig absorbiert. Mit Quarz kann man bis zu 200 $\mu\mu$ vordringen. Mit Flußspath gelangt man bis zu 185 $\mu\mu$. Noch kürzere Wellenlängen werden vom Licht und der photographischen Trockenplatte absorbiert. Neuerdings gelang es allerdings V. Schumann, Leipzig, durch Luftleerpumpen[2] der photographischen Kamera und dadurch, daß er Platten[3] von Bromsilber ohne jedwedes Bindemittel anwandte, noch etwas weiter ins Ultraviolette vorzudringen. Die Arbeit stand erst später zur Verfügung[4], und es war deshalb bei Herstellung des Apparates auf eine Evakuierung der Kamera keine Rücksicht genommen worden. Spektrallinien von so kleiner Wellenlänge sind auch selbst bei Verwendung der oben genannten Bromsilberplatten so lichtschwach, daß sie durch eine Absorptionsflüssigkeit nicht mehr hindurch gelangen würden.

[1] Königsberger, Physikal. Zeitschrift 1903, Bd. **4**, S. 347.

[2] Photographische Rundschau 1897.

[3] Annalen der Physik, **5**, S. 349, 1901.

[4] Ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Dr. V. Schumann für sein freundliches Entgegenkommen und seine wertvollen Ratschläge herzlich danken.

Natürlich wurden alle Linsen von Quarz hergestellt und zwar so, daß die geometrische Axe der Linse mit der optischen Axe des Kristalls zusammenfiel. Bei der Herstellung des Apparates mußte ferner ein verstellbarer, bis auf ein Minimum schließender Spalt aus folgender Überlegung angebracht werden. Sehr kurze Spaltöffnungen kommen bei lange währenden Aufnahmen, z. B. eines Funkenspektrums, wie es in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, in Betracht. Benutzt man nämlich bei längerer Belichtung größere Spaltbreiten, dann wird die Platte durch diffuses Licht so stark verschleiert, daß sich nach der Entwickelung die an und für sich schon schwache Lichtwirkung des ultravioletten Teils gar nicht vom Plattengrund abhebt. Aus diesem Grunde ist eine Photographie im ultravioletten Spektrum an ganz winzige Spaltbreiten gebunden. Je näher sich die Lichtquelle am Spalte befand, um so weniger klar erschienen die Linien, manchmal trat sogar die Verdoppelung derselben ein. Wurde die Lichtquelle in einiger Entfernung (ca. 8 bis 10 cm) vom Spalt aufgestellt, so wuchs die Linienschärfe. Jedoch verlor das Licht dadurch an Intensität. Um diesen Nachteil aufzuheben, wurde ein Kondensor[1] nach Victor Schumann angewandt.

Der Unterschied zwischen der Einstellung des Spektrographen nach Schumann und der bei dieser Arbeit angewandten bestand darin, daß Schumann direkt am Spalt ein kleines fluoreszierendes Gläschen

[1] Eder's Jahrbuch für Photogr. 1889, S. 238.

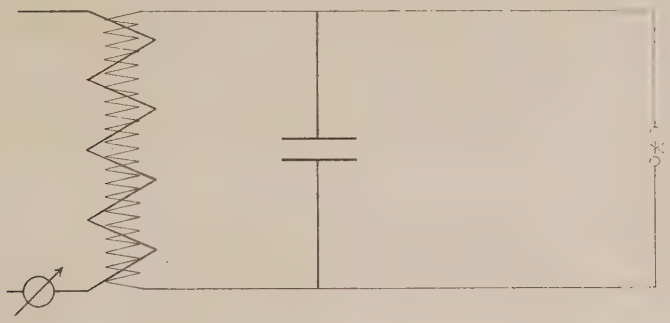
anbrachte, während hier die Einstellung für ultraviolettes Licht auf einer Einstellscheibe bewirkt wurde.

Tafel I zeigt die Photographie des angewendeten Spektrographen. Am Kollimatorrohre befindet sich der Spalt, der verstellt und mittels einer Metallscheibe, die von außen drehbar ist, verschlossen werden kann. Durch diesen Verschluß wird die Dauer der Expositionszeiten geregelt. Hinter den Spalt wird ein 2—4 cm langes Absorptionsgefäß eingesetzt. Zu diesem Zwecke ist im Kollimatorrohr eine Öffnung angebracht, welche nach Einführung des Gefäßes wieder lichtdicht verschlossen werden kann. Bei sehr intensivem Licht, z. B. dem elektrischen Bogenlicht, empfiehlt es sich, das Absorptionsgefäß in einen besonderen Behälter einzustellen, wie auf Tafel II abgebildet ist. Wenn nämlich durch Strahlung eine starke Erhitzung eintritt, so würde eine Flüssigkeit leicht zersetzt werden. Sehr zweckmäßig ist es daher, den Behälter durch eine Wasserumspülung kalt zu halten. Natürlich müssen auch die Absorptionsgefäße aus Quarz bestehen. Da Gefäße, vollständig aus Quarz hergestellt, zu kostspielig sind, so wurden Glasröhren von 2—4 cm Länge angewandt und auf die Enden derselben mit Kanadabalsam Quarzplatten gekittet, welche natürlich planparallel und senkrecht zur Kristallaxe geschnitten sein müssen. In der Mitte dieser Gefäße ist eine Öffnung mit einem eingeschliffenen Glasstöpsel angebracht, in welche die Absorptionsflüssigkeit am besten mit einer Pipette eingeträufelt wird. Tafel II zeigt die Abbildung der Röhren.

Nach dem Kollimatorrohr folgt das Prismatischchen und das Objektivrohr mit Kamera. Letztere ist an einem um die Spektrographenaxe drehbaren Trägerarm montiert. Hinter dem Objektiv der Kamera ist eine Irisblende angebracht. Das Kameraobjektiv kann ebenfalls mit einer verstellbaren Schraube eingestellt und die Einstellung an einer mm-Teilung abgelesen werden.

Die Mattscheibe steht nicht dauernd senkrecht zur Linsenaxe, sondern kann zur Erzielung einer größeren Dispersion gegen dieselbe geneigt werden. Die Größe des Neigungswinkels ist an einem Teilkreise ablesbar. Durch eine Vertikalverschiebung kann außerdem die Platte so weit gehoben oder gesenkt werden, daß bis zu sieben Aufnahmen unter einander Platz finden. Einer Umdrehung der Schraube entsprach bei dem angewandten Apparat eine Plattenverschiebung von 4 mm. Die Einstellung geschieht mit einer Scheibe, deren obere Hälfte aus Uranglas, deren untere aus Mattglas besteht. Uranglas besitzt nämlich die Eigenschaft, zu fluoreszieren. Diese Fluoreszenz wird hauptsächlich durch Absorption der violetten und ultravioletten Strahlung erzeugt. Wird durch Senkung der Platten die Uranglasscheibe an die erleuchtete Stelle geschoben, so ist das nunmehr sichtbare Spektrum länger als das erste. Die ultraviolette Strahlung wird also durch Erregung von Fluoreszenz sichtbar. Das ganze Fluoreszenzspektrum erscheint grün. Mit einer Lupe kann man nun auch im Ultravioletten scharf einstellen. Um die Ausdehnung des ohne Fluoreszenz sichtbaren Spektrums zu ermitteln, wurde die Scheibe bis zur

Mattglasschicht gehoben. Dann war die Länge des sichtbaren Spektrums nur ca. 1 cm. Das Fluoreszenz-Spektrum dagegen ergab sich zu 5,6 cm. Man erhält also als ultraviolettes Spektralgebiet ungefähr die sechsfache Länge des ohne Fluoreszenz sichtbaren Spektrums. Als Lichtquelle wurde nach den Angaben von Kobert eine Bogenlampe benutzt. Das elektrische Licht besitzt aber im Ultravioletten selbst starke Absorptionsbänder. Das Spektrum weist auch sonst verschiedene Verunreinigungen auf, die der Kohle stets anhaften (wie z. B. Kieselsäure, Metalle etc). Nach angestellten Versuchen wurde daher vom Bogenlicht abgesehen. Es gelangte nun eine Funkenstrecke zur Benutzung. Beiliegende Zeichnung veranschaulicht die Schaltung.



Der elektrische Strom wurde durch ein Induktorium von 30 cm Schlagweite geliefert, welches mit 6 Amp. bei 55 Volt betrieben wurde. Der Sekundärstrom ging zu den beiden Belegungen von drei neben einander geschalteten Leidener Flaschen. Diese entluden sich

dann mit sehr intensivem, grellem Licht durch eine 1,2 mm lange Funkenstrecke zwischen zwei Zinkcadmiumdrähten. Die Tafel I veranschaulicht die Anordnung der gebrauchten Instrumente.

Im folgenden soll nach Pfaundler[1] eine Tabelle die Zusammenstellung einiger Wellenlängen des Lichtes und der zugehörigen Farben zeigen. Die Wellenlängen der chemisch wirksamen Strahlen umfassen im ganzen sechs Oktaven, während der sichtbare Teil nur eine Oktave beträgt.

[1] Müller-Pouillet, Optik 1901.

Wellenlängen.[1]

Wellenlänge in millionstel Millimetern	Schwingungszahl pro Sekunde		Charakter
8070 $\mu\mu$	37 Billionen		Längste Welle, gemessen von Rubens und Snow mit Flußspatprisma und Bolometer[2].
812 „	369 „		Längste ausnahmsweise sichtbare Lichtwelle nach Helmholtz.
683 „	437 „	Sichtbares Spektrum	Rotes Licht.
615 „	485 „	Sichtbares Spektrum	Oranges „
559 „	534 „	Sichtbares Spektrum	Gelbes „
512 „	582 „	Sichtbares Spektrum	Grünes „
439 „	679 „	Sichtbares Spektrum	Blaues „
410 „	728 „	Ultraviolett	Violettes „
330 „	909 „	Ultraviolett	Kürzeste sichtbare Welle nach Soret.
210 „	1429 „	Ultraviolett	Kürzeste von einem Menschenauge gesehene Welle nach Mascart.
185 „	1622 „	Ultraviolett	Grenze der mittels Flußspatprismen erhaltenen Photographien.
100 „	3000 „	Ultraviolett	Kürzeste von V. Schumann photographierte Welle[3]. (Bromsilber-Platte.)

[1] Müller-Pouillet, 2. Bd., 1901.

[2] Seither sind H. Rubens und E. Aschkinaß mit Sylvin-Reststrahlen sogar bis zu Wellenlängen von 61 100 $\mu\mu$ gelangt. Wied. Ann. **65**, S. 241, 1898.

[3] Über eine neue, in hohem Grade ultraviolettempfindliche Platte vergl. V. Schumann, Annalen der Physik, **5**, S. 349, 1901: „Die Photographie des Spektrums jenseits 182 $\mu\mu$ ist auf die ultraviolette Platte allein angewiesen“.

Zum Vergleich sollen hier nach Landolt-Börnstein[1] noch die Wellenlängen aller Fraunhofer'schen Linien in millionstel Millimetern ($\mu\mu$) angegeben werden:

A	760,40	K	393,33
B	686,71	L	381,96
C	656,213	M	372,62
D_1	589,513	N	358,18
D_2	588,912	O	344,10
E	526,913	P	336,00
b_1	518,310	Q	328,63
b_2	517,22	R	317,98
b_3	—	r	314,47
b_4	516,688	S_1	310,08
F	486,074	S_2	309,97
G	430,725	s	304,65
h	410,12	T	301,96
H	396,81	t	299,44
		U	294,77

Unter Zugrundelegung dieser Tabellen werden die unten angeführten Resultate besser verständlich. Tafel III veranschaulicht die bisher bekannten Absorptionsspektra des Blutes und seiner Derivate und ist nach einer Tafel von Dr. Franz Müller, Berlin, angefertigt.

Wir kommen nun zu der Betrachtung der gefundenen Resultate. Bei den dargestellten Photographien

[1] Landolt-Börnstein, Physikal.-chemische Tabellen. 2. Auflage, 1894, S. 380.

sind an der Einstellung des Apparates folgende Daten von Wichtigkeit. Nachdem das Prisma genau justiert und auf das Minimum der Ablenkung gebracht war, ergab sich der Ablenkungswinkel zu 43° 40′. Die Schiefstellung der Platten zeigte, mit der Lupe betrachtet, bei 30° das schärfste ausgezogene Spektrum. Das Kamera-Objektiv war bei 3,5 mm scharf eingestellt. Die Expositionszeit hängt von der Konzentration der Flüssigkeit und von der Empfindlichkeit der Platte ab. Im Durchschnitt währte eine Aufnahme 20 Minuten. Am besten eigneten sich Schleußnersche Platten auf dünnstem Spiegelglas. Die Entwickelung der Platte geschah mit Rodinal und dauerte im Durchschnitt zehn Minuten. Die Konzentration des Entwicklers war 1 : 30,0. Stärkere oder noch schwächere Lösungen erwiesen sich als nicht brauchbar.

Resultate.

Im folgenden sind für die oben angegebenen Blutpräparate die Absorptionsstreifen im Ultraviolett des Spektrums zusammengestellt, soweit die zwei- bis dreimalige photographische Aufnahme solche mit Sicherheit erkennen ließ. Im Gebiet von 324—280 $\mu\mu$ besitzt das zu Grunde liegende Zink-Cadmiumspektrum selbst nur recht lichtschwache Linien, so daß in einigen Fällen Zweifel entstehen konnten, ob hier die Linien durch eine eingeschobene Blutlösung absorbiert oder nur durch die allgemeine Lichtschwächung unsichtbar wurden. Überall, wo die Originalplatten auch nur eine Spur der Linien in diesem Gebiet erkennen ließen, wurde ein Absorptionsstreifen nicht angenommen.

Die Festlegung der Wellenlängen geschah durch Vergleichung mit den bekannten Zink-Cadmiumlinien, indem man für diese, wie Tafel IV, Figur 1 zeigt, die Linien als Abscissen, die zugehörigen bekannten Wellenlängen als Ordinaten graphisch auftrug und die zugehörige Dispersionskurve konstruierte. An dieser Kurve ließen sich dann die Wellenlängen der Absorptionsbänder direkt ablesen. Bei der Wellenlängenbestimmung war die Länge der Ordinate doppelt so groß gewählt, um eine höhere Genauigkeit zu erzielen.

Unter dieser Figur zeigt Tafel IV die Absorptionsspektra der Blutlösungen nach den Originalplatten, aber etwas vergrößert und leicht retouchiert. Die Wellenlängenbestimmungen wurden nach einem unretouchierten Abzug gemacht. Oberhalb und unterhalb der Absorptionsspektra sind zur größeren Übersichtlichkeit je ein Vergleichsspektrum hinzugefügt. Links ist der dem Rot zugewendete Teil des Spektrums.

Oxyhaemoglobin 1 %.

Erster Streifen zwischen 384—334, ein zweiter Streifen zwischen 280—257 $\mu\mu$. Bei 250 $\mu\mu$ tritt völlige Auslöschung ein.

Haemoglobin 1 %.

Nur ein Absorptionsband zwischen 332—278 $\mu\mu$, von 250 $\mu\mu$ völlige Dunkelheit.

Methaemoglobin 1 %.

Nur ein Absorptionsband zwischen 332—278 $\mu\mu$, von 250 $\mu\mu$ tritt wieder Auslöschung ein.

Cyan-Haemoglobin 1 %.

Ein Absorptionsstreifen zwischen 384—334 $\mu\mu$, ein zweiter zwischen 306—280 $\mu\mu$ (ein dritter zwischen 280—260?), von 250 $\mu\mu$ findet Auslöschung statt.

Kohlenoxydhaemoglobin 1 %.

Ein Absorptionsstreifen zwischen 302—278 $\mu\mu$, ferner von 276—262 $\mu\mu$, von 251 $\mu\mu$ wird alles absorbiert.

Haematin sauer

zeigt zwischen 390—336 $\mu\mu$ und zwischen 330—280 $\mu\mu$ Absorption, von 243 $\mu\mu$ tritt völlige Auslöschung ein.

Haematin alkalisch

von 420 $\mu\mu$ völlige Absorption.

Haemochromogen

von 420 $\mu\mu$ an völlige Absorption.

Haematoporphyrin

ebenfalls von 420 $\mu\mu$ an völlige Absorption.

Nitritmethaemoglobin

zeigt zwei scharfe Absorptionsbänder zwischen 370 bis 340 $\mu\mu$, ferner zwischen 282 und 216 $\mu\mu$, von 214 $\mu\mu$ an wird alles absorbiert.

Aus diesen Zusammenstellungen ist ersichtlich:

1) daß die O_2-Verbindung des unzersetzten Blutfarbstoffes (O_2Hb) zwei Absorptionsstreifen im Ultravioletten besitzt;
2) daß das sauerstoffreie Haemoglobin (Hb) dagegen nur einen Streifen im Ultravioletten hat;
3) daß das Methaemoglobin einen mit den vorgenannten Streifen identisches Absorptionsband besitzt;
4) daß das Cyan-Hb und das Nitrit-Met-Hb dagegen wieder deren zwei haben;
5) daß das COHb entsprechend dem O_2Hb zwei Absorptionsbänder im Ultravioletten besitzt, die aber mit denen des O_2Hb nicht identisch sind;
6) daß das Haematin nur in saurer, aber nicht in alkalischer Lösung zwei Absorptionsstreifen im Ultraviolett besitzt;

7) daß das Haemochromogen von 420 $\mu\mu$ ab völlig auslöscht, so daß von Streifen keine Rede ist, und
8) Haemotoporphyrin ebenfalls das ultraviolette Licht (von 420 $\mu\mu$ ab völlig) auslöscht.

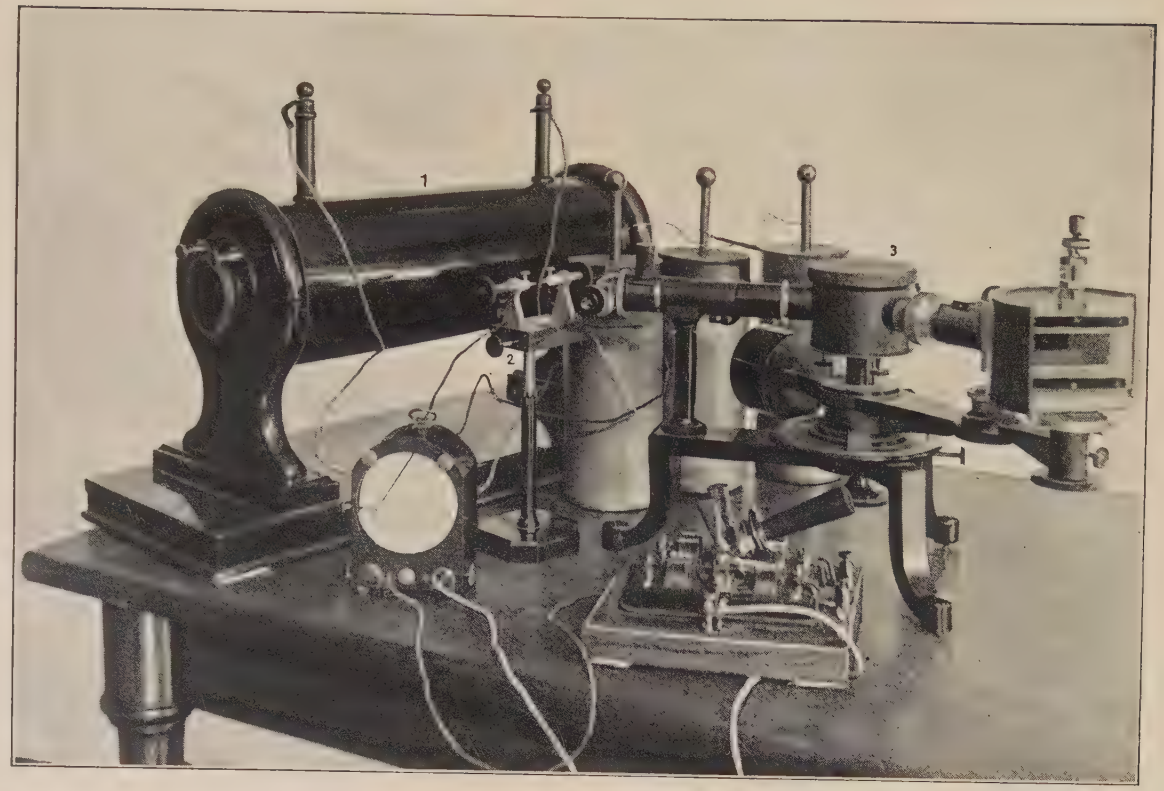
In der beigegebenen Zeichnung (Tafel V) sind die gefundenen Absorptionslinien in einer Wellenskala mit Berücksichtigung der Fraunhoferschen Linien des Sonnenspektrums eingetragen.

Die Frage nach der Existenz ultravioletter auswählender Absorption des Lichtes durch den Blutfarbstoff und seine Zersetzungsprodukte ist damit endgültig gelöst. Von besonderer Bedeutung für die gerichtliche Blutuntersuchung ist noch, daß das in schwierigen Fällen, d. h. bei Untersuchung sehr alter Blutspuren, meist vorliegende Haematin sich in saurer Lösung durch Aufnahme seines ultravioletten Spektrums nachweisen läßt.

Die Anregung zu vorstehender Arbeit erhielt ich von Herrn Prof. Dr. R. Kobert, dem Direktor des pharmakologischen Instituts der Universität zu Rostock. Sie wurde im physikalischen Institut ausgeführt. Meinen hochverehrten Lehrern, Herren Prof. Dr. R. Wachsmuth und Prof. Dr. R. Kobert, für ihre wertvollen Ratschläge an dieser Stelle zu danken, ist mir eine angenehme Pflicht. Durch das freundliche Entgegenkommen des Herrn Direktors Prof. Dr. med. et phil. Ludwig Matthiessen wurde mir ein Spektrograph, wie ich ihn brauchte, zur Verfügung gestellt, wofür ich ganz besonderen Dank schulde.

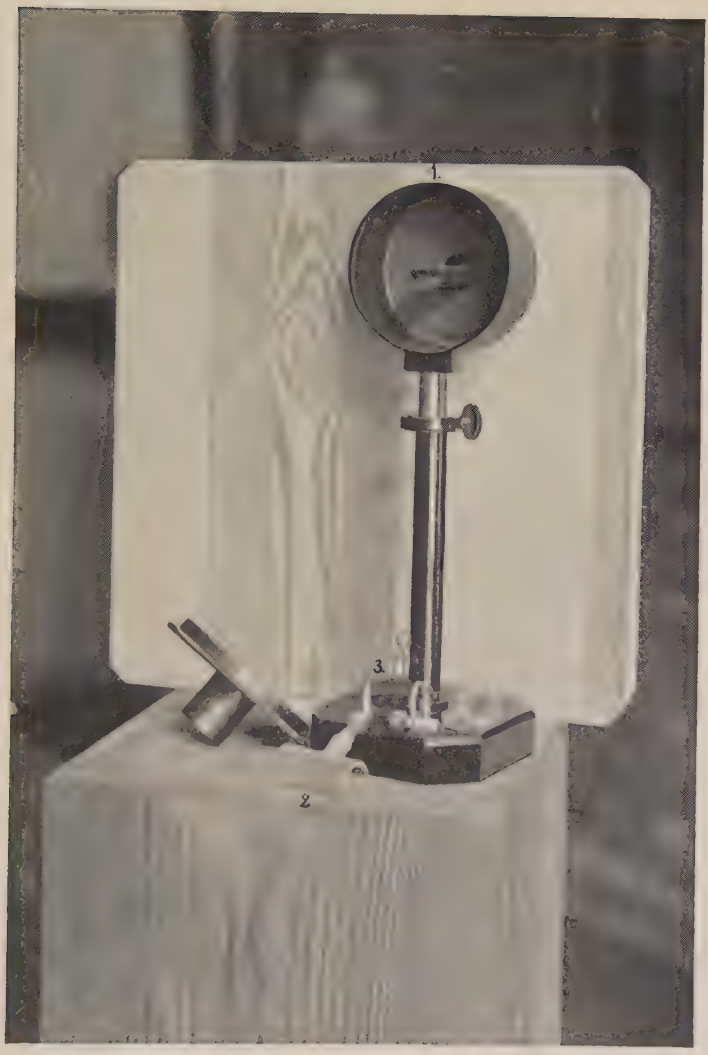
Tafel I.

Angewandter Apparat.



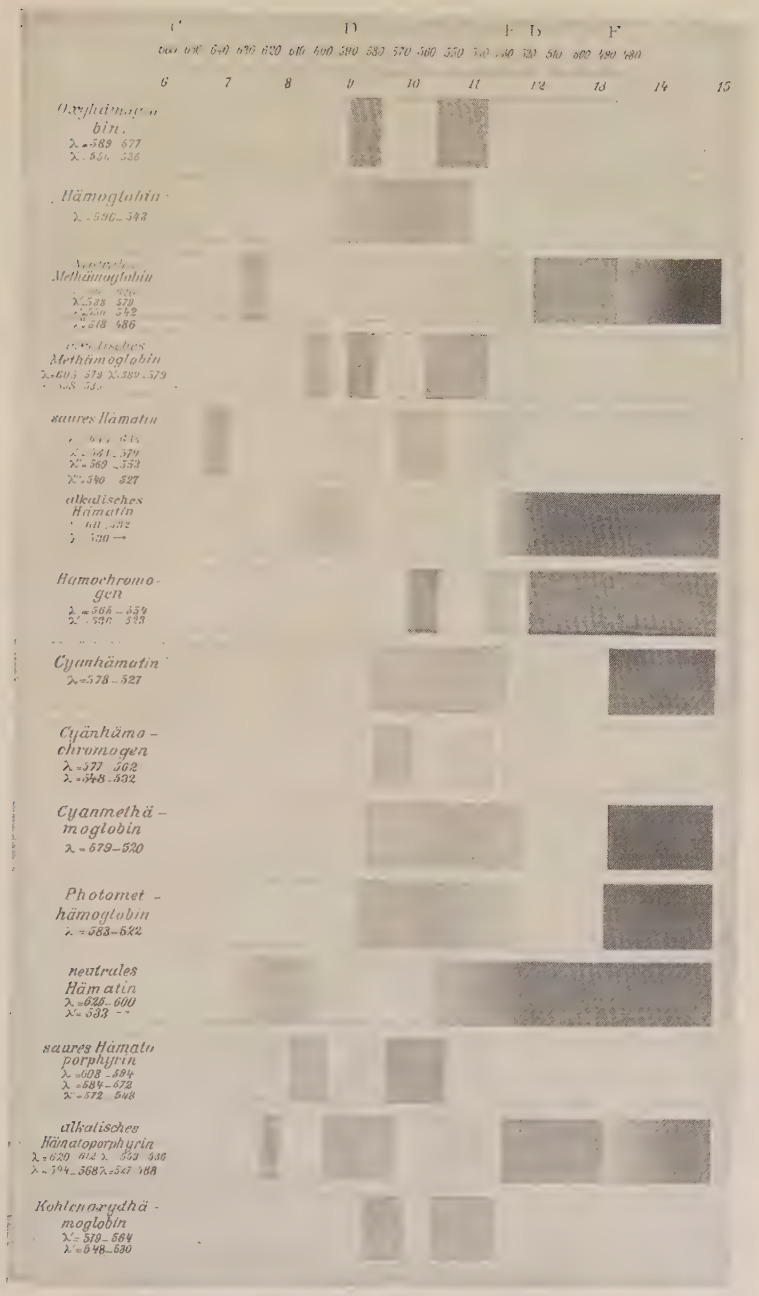
1. Induktorium. 2. Funkenstrecke. 3. Spektrograph.

Tafel II.



1. Behälter der Absorptionsgefäße.
2. Die Absorptionsgefäße.
3. Das gefüllte Absorptionsgefäß mit aufgekitteten Quarzplatten.

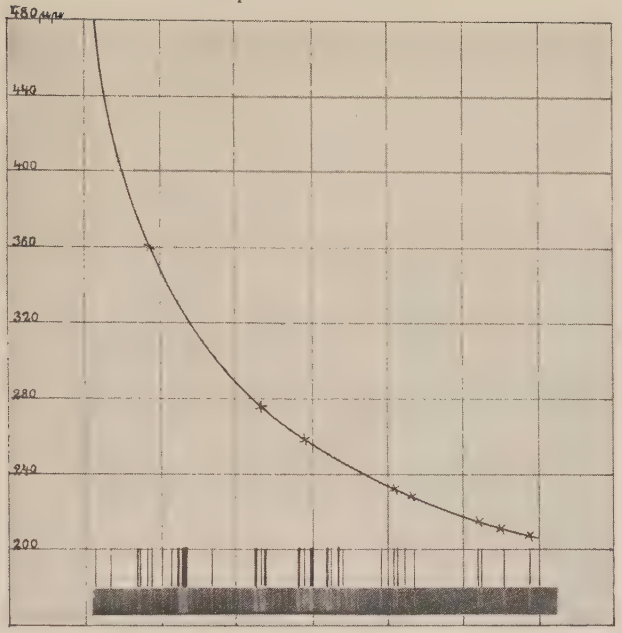
Tafel III.



Tafel nach Dr. Franz Müller.

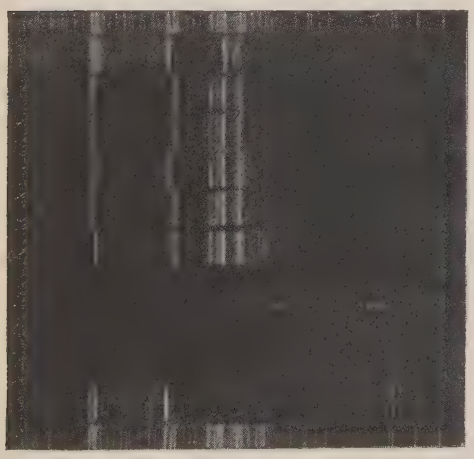
Tafel IV.

Dispersions-Kurve.



Figur 1.

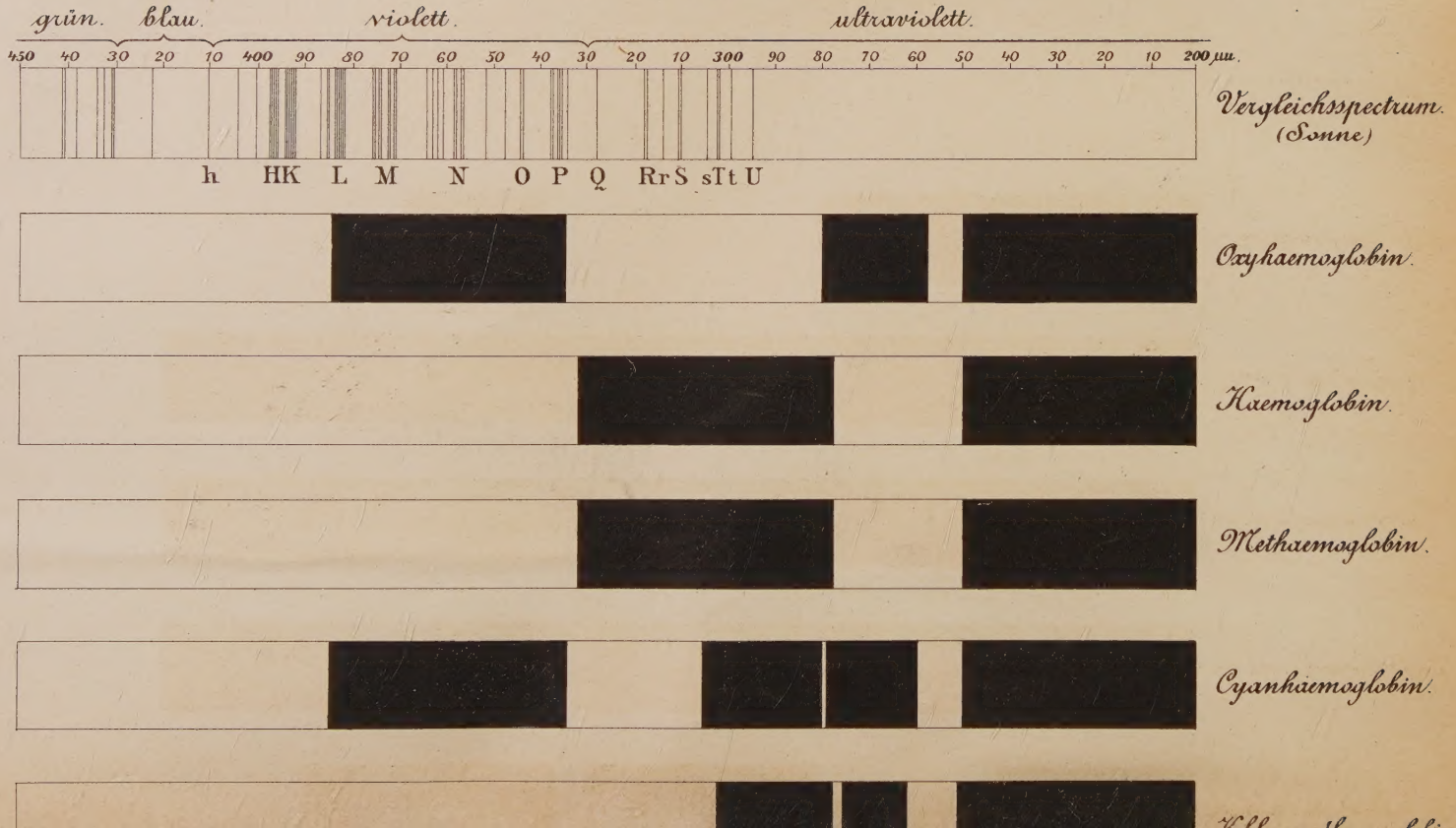
Blutspektra im Ultravioletten.

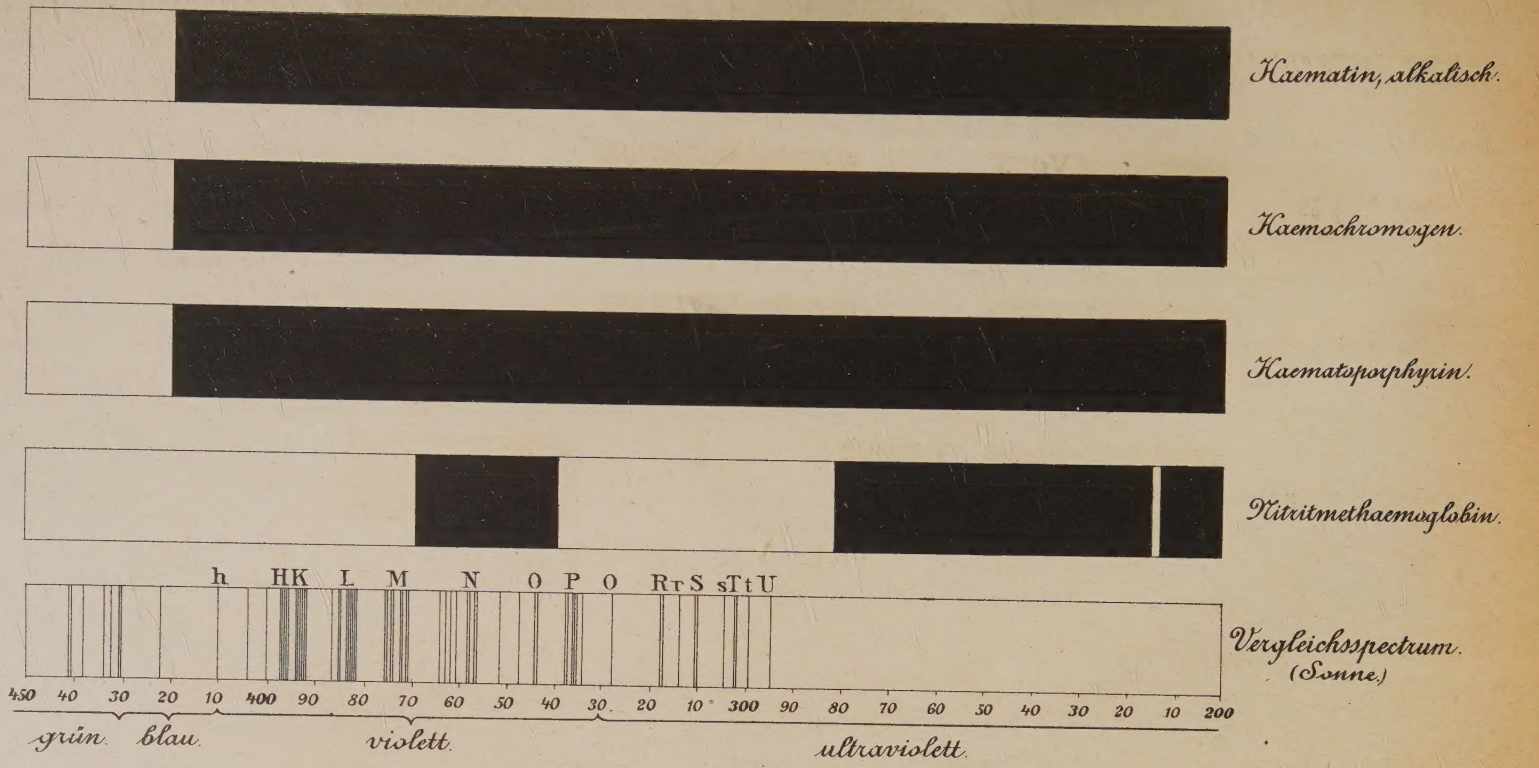


Vergleichsspektrum
Oxyhaemoglobin
Haemoglobin
Methaemoglobin
Cyanhaemoglobin
Kohlenoxydhaemoglobin
Haematin sauer
Haematin alkalisch
Haemochromogen
Haematoporphyrin
Nitritmethaemoglobin
Vergleichsspektrum

Figur 2.

Tafel V.


grün.
blau.
violett.
ultraviolett.
450 40 30 20 10 400 90 80 70 60 50 40 30 20 10 300 90 80 70 60 50 40 30 20 10 200 μμ.
h HK L M N O P Q Rr S sT t U
Vergleichsspectrum. (Sonne)
Oxyhaemoglobin.
Haemoglobin.
Methaemoglobin.
Cyanhaemoglobin.


Haematin, alkalisch.
Haemochromogen.
Haematoporphyrin.
Nitritmethaemoglobin.
h HK L M N O P O R r S sT t U
Vergleichsspectrum.
(Sonne.)
450 40 30 20 10 400 90 80 70 60 50 40 30 20 10 300 90 80 70 60 50 40 30 20 10 200
grün
blau
violett
ultraviolett